中華農業研究 (Jour. agric. Res. China) 29(4):309～319 (1980)

蘆筍花葯培養單倍植物體形成之研究[1]

蔡新聲　賴本智　紀迺淳[2]

摘要：含有 2 mg/l NAA (Naphthalene acetic acid), 1 mg/l BA (N^6-Benzyladenine), 6% sucrose 及將無機鹽類減半 (Na-Fe-EDTA 除外) 之 Murashige and Skoog (1962) 培養基，可誘導蘆筍單核期的花葯產生極高百分率的花葯 callus。不同品種間誘導 callus 形成的百分率差異極大。UC 309 第一次花粉有絲分裂期所培養的花葯，黑暗處理者優於照光處理者。植株間花葯具有不同的 callus 形成力，這種株間巨大的差異可能是幾次試驗無法獲得一致結果的主要原因。

蘆筍花葯培養 callus 的形成，與花葯的褐化有明顯的相關 (相關係數 r＝0.8046**)，大部分產生 callus 的花葯，都在培養後 3 週褐化；變成白色的花葯，形成 callus 機會極少。將誘得之花葯 callus 繼代培養於含有 1 mg/l NAA, 0.5 mg/l BA 之 Murashige et al. (1972) 培養基可誘導植物體產生。不同品種間的 callus 具有不同的分化能力。

蘆筍是臺灣目前最重要的經濟作物之一[18,30,33]，由於其爲雌雄異株，並可多年生宿根，而雄株嫩莖的產量高於雌株[19,22,31,38]，因此如以育種方法使其全爲雄株，則嫩莖產量將可大大提高。蘆筍一般均以種子繁殖，根據種子無法分辨性別，且各株間之生產力亦因雜交後之表現各有不同[20,35]，以致產量常無法達到理想而穩定的境界。利用花葯培養獲得的雄性單倍體，經染色體倍加後所得的超雄性雙倍體 (MM)，若與雌性個體交配，則所得 F_1 種子可全爲雄性且一致的個體 (Mm)，這種新的育種方法，近幾年來已成爲世界蘆筍先進國所急欲達成的理想目標[1,3,5,6,7,11,17,23,28,29,32,38,39]。本研究之目的在找出蘆筍花葯培養 callus 形成之最適培養基，最適培養期，及影響花葯培養之種種因子，以爲今後超雄性育種之參考。

材料與方法

花葯培養所用的材料爲 UC 157, UC 309, UC 500, UC 711, UC 800 及 Mary Washington 等美國引進之蘆筍品種，種植於臺南改良場本場及義竹蘆筍工作站試驗農場，分別在民國 68 年 10 月，12 月及 69 年 3 月，6 月採取花葯做爲各試驗之材料。

試驗初期採取 UC 309 品種不同大小之花蕾，分別以醋洋紅壓潰法檢定花粉之發育時期[37]，再以檢定所得花蕾的大小，做爲小胞子不同發育時期的指標。每次試驗將所採取之蘆筍花蕾經 10°C 低溫儲藏 5 小時後 (由臺南搬運至農試所)，以 10% Clorox (含 0.5% NaClO) 消毒 10 分鐘，再以無菌水清洗數次後，將花葯自花蕾中取出接種於培養基上。基本培養基除測定蔗糖濃度及不同植物荷爾蒙含量的試驗外，其餘均採用含有蔗糖 6%，phytagar 0.8%, thiamine・HCl 0.4 mg/l, inositol 100 mg/l 之 Murashige 及 Skoog[26] 基本培養基。pH 先調整爲 5.7±0.1，以

---

1. 臺灣省農業試驗所 研究報告 第 956 號。本試驗承臺灣區洋菇、蘆筍試驗研究審議小組補助，試驗材料承臺南區農業改良場提供，文承劉博士大江斧正，謹此申謝。
2. 本所農藝系技正，技佐及研究助理。臺灣省 臺中縣 霧峰鄉。

15 lb/in², 121°C 高溫高壓消毒 15 分鐘。花葯的採取需特別小心，以避免花葯壁等體細胞組織受到傷害；將所採取的花葯培養於含有 10 ml 裝於 25×120 mm 試管之培養基上，並於 27°±1°C 的恒溫，以黑暗或 1,000 lux，每日 16 小時的照光下培養，花葯 callus 誘導植物體分化之試驗均行照光處理。

結 果

以兩種蔗糖濃度，四種植物荷爾蒙在數種不同濃度組合下而成七種不同的培養基，測定誘導蘆筍花葯 callus 形成之最佳培養基，結果顯示 NAA 濃度高至 4 mg/l 或不含 NAA 及 2, 4-D (2, 4-dichlorophenoxy acetic acid) 等 auxin 之培養基無法誘導蘆筍花葯 callus 之形成；BA 之效果優於 kinetin，最適誘導花葯 callus 之培養基爲各 2 mg/l NAA 及 BA 配合 6% sucrose，其誘導率爲 21.1% (表 1)，本試驗 BA 只有 2 mg/l 一種濃度，其與 2 mg/l NAA 組合之最適測定濃度如表 2 顯示，在五種受測濃度中，以含 1 mg/l BA 與 2 mg/l NAA 及 6% sucrose 配合之培養基，誘導花葯 callus 之百分率最高爲 42.6%，減低或增加 BA 之濃度，均使花葯 callus 之誘導能力降低。綜合表 1，2 之結果，可知蘆筍花葯培養 callus 之誘導以含有 2 mg/l NAA, 1 mg/l BA 及 6% sucrose 之 Murashige and skoog (1962) [26] 基本培養基最適當。

表 1. 植物荷爾蒙及蔗糖對蘆筍 UC 309 晚單核期之花葯誘導 Callus 形成之效應

Table 1. The effects of plant hormones and sucrose on callus formation from asparagus anthers cultured at late uninucleate pollen stage (cv. UC 309).

Sucrose concentration	Plant hormone				No. of anthers cultured	% of anther forming callus
	2, 4-D	NAA	BA	Kinetin		
—%—	—mg/l—	—mg/l—	—mg/l—	—mg/l—		
3	0	0	0	0	196	0.0
3	0	2	0	2	72	16.7
3	1	0	0	0	57	5.3
6	0	2	0	4	116	12.9
6	0	2	2	0	104	21.1
6	2	0	0	2	63	17.5
6	0	4	0	2	108	0.0

Culture began on Oct. 20, 1979.
Duration of culture : 50 days.

花葯培養 callus 之能否形成常決定於培養花葯之發育時期，表 3 爲蘆筍以含 2 mg/l NAA, 1 mg/l BA 及 6% sucrose 之 MS 培養基，培養五種不同小胞子發育時期之花葯所得之結果，以早雙核期所得花葯 callus 72.2 % 最高，時期愈早，形成 callus 的能力也愈差，四分子期及早單核期之花葯不具誘導 callus 的能力。

表 2. Benzyladenine 對蘆筍 UC309 晚單核期之花葯誘導 callus 形成之效應

Table 2. Effects of 6-Benzyladenine on callus formation from asparagus anthers cultured at late uninucleate pollen stage (cv. UC309).

Concentration of 6-Benzyladenine	No. of anthers cultured	% of anther forming callus
—mg/1—		
0.5	109	15.6
1.0	115	42.6
2.0	110	13.6
4.0	110	26.4
8.0	115	16.5

Culture began on Dec. 12, 1979.

Basal medium : 1/2 Murashige and Skoog salts (1962) supplemented with 2 mg/1 NAA, and 6% Sucrose.

表 3. 花粉發育時期對蘆筍 UC309 誘導花葯 callus 形成的影響

Table 3. Effects of pollen developmental stage on callus formation in anther culture of asparagus (cv. UC309).

Developmental stage of microspores	No. of anthers cultured	% of anther forming callus
Tetrads	102	0.0
Early-uninucleate	81	0.0
Late-uninucleate	110	13.6
First-pollen mitosis	120	55.8
Early-binucleate	126	72.2

Cultre began on Dec. 12, 1979.

Basal medium : 1/2 Murashige and Skoog medium (1962) supplemented with 2 mg/l NAA, 2 mg/l BA and 6% sucrose.

根據表1，2及3所得結果之最適培養基及花葯之最適培養期 ，所做五種栽培品種間 ，花葯 callus 誘導之能力差異極大（表4），以 UC 157 最高，Mary Washington 最低。此試驗 UC 309 僅有 12% 的花葯形成 callus，較之前一試驗的 72.2%（表 3）誘導率差異極大，顯示蘆筍花葯培養的結果，除了受培養基及培養環境的影響外，還受其它因素所左右。

小胞子發育時期是許多影響花葯培養成功與否中最重要的一個因子。前人研究的結果大部份認爲蘆筍花葯之最適培養期爲單核期[11,28]，而本研究（表3）卻顯示爲早雙核期。因之再以 UC 309 的三種小胞子發育時期配合照光或不照光處理，測定蘆筍小胞子發育時期對花葯培養之影響。

表 4. 蘆筍品種間早雙核期花葯培養 callus 形成之差異

Table 4. Influence of genotype on callus formation from asparagus anthers cultured at early binucleate pollen stage.

Variety	No. of anthers cultured	Anthers turning brown		Anthers forming callus	
		Number	%	Number	%
UC 157	180	136	80.0	50	27.8
UC 309	183	85	46.0	22	12.0
UC 711	58	30	52.0	7	12.1
UC 800	108	20	18.5	3	2.8
Mary Washington	93	4	4.3	0	0.0

Culture began on Mar. 7, 1980.

Basal medium : 1/2 Murashige and Skoog medium (1962) supplemented with 2 mg/l NAA, 1 mg/l BA and 6% sucrose.

表 5. 光照及花粉發育時期對蘆筍花葯 callus 形成的影響

Table 5. Influence of illumination on callus formation from asparagus anthers cultured at different developmental stages of microspores (cv. UC 309).

Developmental stage of microspores	Treatment	No. of anthers cultured	Anthers turning brown		Anthers forming callus	
			Number	%	Number	%
Uninucleate	Light	118	118	100.0	69	58.5
Mitosis	Light	116	112	96.5	22	19.0
Binucleate	Light	183	85	46.0	22	12.0
Uninucleate	Dark	106	106	100.0	70	66.0
Mitosis	Dark	103	100	97.1	55	53.4
Binucleate	Dark	110	40	36.4	11	10.0

Culture began on Mar. 7, 1980.

Basal medium : 1/2 Musashige and Skoog medium (1962) supplemented with 2 mg/l NAA, 1 mg/l BA and 6% sucrose.

表 5 顯示無論照光或不照光處理，都以單核期的花葯爲最適培養期，其 callus 的形成力，照光與不照光處理，分別爲 58.5 及 66.0% ，花粉第一次有絲分裂期次之，分別爲 19.0 及 53.4% 。雙核期最差 ，分別爲 12.0 及 10.0 % 。單核期及雙核期 callus 之形成與否似乎與照光關係不大，但第一次有絲分裂期培養之花葯，其黑暗處理 callus 之形成率可高出照光者 3 倍之多，且黑暗下 callus 之顏色淡黃，與照光下之 callus 呈黃褐色比較，似乎顯出黑暗下之 Callus 較不易老化。

在獲得了表 3 ，表 5 兩種截然不同的結果之後，再以表 5 所得單核期爲蘆筍最適培養期之結果，培養 6 個蘆筍品種，並以 UC 157 及 UC 309 再次檢定蘆筍花葯培養之最適時期。爲求採取之花葯具代表性，每個品種或處理都是採自至少五株以上的花葯混合培養。

表 6. 品種間差異及不同發育時期之花藥對 callus 形成的影響

Table 6. Influence of genotype and pollen developmental stage on callus formation in anther culture of asparagus.

Variety and pollen stage	No. of anthers cultred	Anthers turning brown		Anthers forming callus	
		Number	%	Number	%
UC157-uninucleate	308	217	96.4	137	44.4
-binucleate	71	50	70.4	15	21.1
UC309-uninucleate	109	91	83.5	72	66.1
-mitosis	112	42	37.5	16	14.3
-binucleate	102	9	8.8	0	0.0
UC500-uninucleate	167	151	90.4	85	50.9
UC711-uninucleate	159	49	30.8	25	15.7
UC800-uninucleate	160	159	99.4	111	69.4
Mary Washington-uninucleate	166	107	64.5	27	16.3

Culture began on June 13, 1980.

結果在受測 6 品種中，花藥 callus 誘導力較高的品種爲 UC 157, UC 309, UC 500 及 UC 800 等 4 品種，分別爲 44.4%，66.1%，50.9%及 69.4%，較差的兩品種爲 UC711 及 Mary Washington，其花藥 callus 之誘導率爲 15.7%及 16.3%。不同小胞子發育時期培養所得的結果大抵和表 5 相同，UC 309 單核期之花藥培養，callus 形成率高達 66.1%，與表 5 之 66% 相似。但第一次有絲分裂期及雙核期卻顯示出大幅度的降低（表 6）。多次的試驗都無法得到一致的結果，似乎與取材自單株或族羣有關，爲了解這個問題，以單核期的兩個蘆筍品種，在採取花藥時，以株爲單位培養，分別測定蘆筍株間是否具有不同花藥 callus 之誘導能力。結果顯示蘆筍花藥 callus 的誘導力，株與株間有極大的差異，如 UC 309 之第 3 號植株，誘導率可高達 93.3%，而 1 號及 2 號植株卻低至 3.7 及 7.6%，相同的情形也在 UC 157 產生（表 7），這種株間巨大的差異可能是數次試驗無法得到完全一致結果的最主要原因。

在調查花藥培養 callus 形成的同時，發現蘆筍花藥會在培養 3 週後變成褐色或白色，這種培養花藥褐變的結果，根據資料顯示，與 callus 的形成有極大的關係。表 8 及表 9 分別爲 UC 309 及 UC 157 調查花藥培養 3 週後褐變或白化與花藥形成 callus 間之關係。

表 8 及表 9 分別顯示培養花藥在 3 週後褐變，其形成 callus 之花藥比不形成者多出 1 至 2 倍（UC 309=281：109, UC 157=101：51），培養 3 週後白化之花藥，形成 callus 與不形成 callus 花藥之比分別爲 UC 309=10：67, UC 157=9：362 所以由表 8，表 9 的資料可以知道會形成 callus 的花藥幾乎都將在培養 3 週後轉變成褐色，培養 3 週仍未褐化的花藥形成 callus 的機會極少。由四次試驗所得培養花藥褐變與 callus 形成百分率的結果（表 4,5,6,7），綜合求其相

表 7. 蘆筍單核期的花葯培養，株間 callus 形成的差異

Table 7. Influence of individual plant on callus formation from asparagus anthers cultured at uninucleate pollen stage.

Variety and plant No.	No. of anthers cultured	Anthers turning brown		Anthers forming callus	
		Number	%	Number	%
UC 157-1	110	59	53.6	48	43.6
-2	115	88	76.5	60	52.2
-3	83	80	96.4	29	34.9
UC 309-1	109	41	37.6	4	3.7
-2	105	56	53.3	8	7.6
-3	120	120	100.0	112	93.3
-4	119	95	79.8	77	64.7
-5	117	92	78.6	51	43.6

Culture began on June 13, 1980.

表 8. 蘆筍培養花葯褐變與 callus 形成之關係 (UC 309)

Table 8. The relationship between anther-browning and callus-formation in asparagus anther culture (cv. UC 309).

Item	No. of anthers produced callus	No. of anthers produced No callus	Total
Number of anthers turning brown after three weeks in culture	281	108	389
Number of anthers turning white after three weeks in culture	10	67	77
Total	291	175	466

表 9. 蘆筍培養花葯褐變與 callus 形成之關係 (UC 157)

Table 9. The relationship between anther-browning and callus formation in asparagus anthers culture (cv. UC 157).

Item	No. of anthers produced callus	No. of anthers produced no callus	Total
Number of anthers turning brown after three weeks in culture	101	51	152
Number of anthers turning white after three weeks in culture	9	362	371
Total	110	413	523

關關係，如圖 1 所示，其相關值高達 r=0.8046** ，可知蘆筍花葯 callus 的形成與否確與花葯的褐化有極明顯的相關關係。

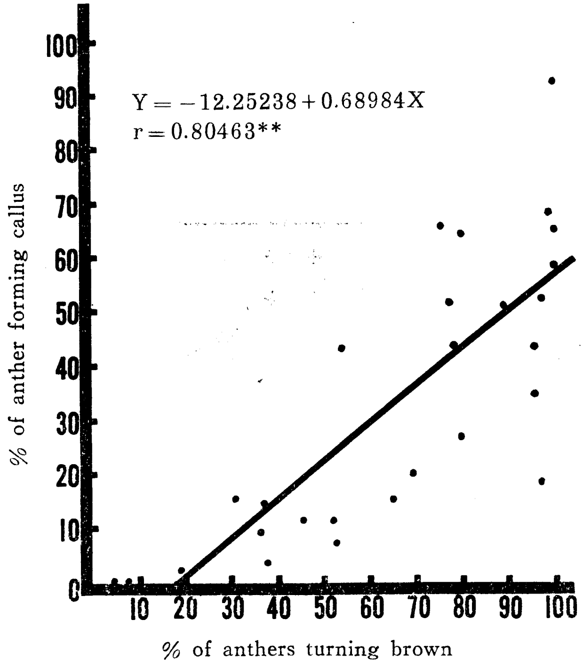

圖 1. 蘆筍培養花葯褐變與 callus 形成之迴歸線

Fig. 1. The regression line between anther-browning and callus formation in anther culture of asparagus.

表 10. 誘導蘆筍花葯 callus 分化器官之培養基

Table 10. Culture media used for organ-formation of asparagus anther callus.

Media No.	Plant hormone	
	NAA	BA
	—mg/l—	—mg/l—
1	0	0
2	0.1	0.5
3	0.3	0.5
4	0.5	0.5
5	0.5	1.0
6	0.5	2.0
7	1.0	0.1
8	1.0	0.5
9	2.0	0.5

Basal Media : murashige, Shabde, Hasegawa, Takatori & Jones (1972).

為促使蘆筍花葯培養所得之 callus 產生植物體的分化 ， 以 9 種不同培養基 (表 10) ，測定 NAA 及 BA 在數種不同濃度組合下，對分化植物體之誘導效果。結果以含有 1 mg/l NAA 及 0.5

mg/l BA 之 8 號培養基所具誘導 callus 分化之能力最强，不同品種間的 callus 所具有之分化能力如表 11 所示。在含有 1 mg/l NAA 及 0.5 mg/l BA 之 Murashige et al. (1972) [25] 培養基中，UC 157 及 UC 309 都有芽體的分化。其它品種因花葯 callus 數量過少，是否具有分化芽體的能力，尚有待進一步的研究。

表 11. 蘆筍品種間花葯 callus 分化器官之差異

Table 11. Influence of genotype on the organ-formation of asparagus anther callus.

Variety	Root formation	Shoot formation
UC 157	+++	+
UC 309	+++	+
UC 500	++	−
UC 711	+++	−
UC 800	+	−
Mary Washington	+	−

討　論

蘆筍花葯培養超雄性個體育成的方法，許多文獻均曾提及 [1,3,5,6,7,11,17,23,28,29]，其單倍體的產生主要係經由 callus [1,11,23,28,39]。有關誘導蘆筍花葯培養 callus 形成的培養基，許多學者看法不同，主要在不同植物荷爾蒙的變化。本試驗結果得知以 6 % sucrose 配合 2 mg/l NAA 及 1 mg/l BA之MS 培養基，對蘆筍花葯 callus 的誘導最適當。

本研究初期試驗，如培養花葯最適花粉發育時期之探討及品種間差異，所得結果不十分一致，究其原因除了母體植物因受氣候，環境因素的影響 [4,8,9,10] 及花粉發育時期的檢定以花蕾長度代表易於造成誤差外 [34]，主要的原因可能爲取樣所造成的結果。初期的試驗，花葯的採取沒有一定的標準，有全部取自單株者，亦有取自田間的大族羣，故試驗常有不合理的結果產生，及至發現蘆筍株間具有不同誘導花葯 callus 的能力，後期的試驗取樣特別小心，所以結果趨於完美。由蘆筍株間花葯 callus 誘導之巨大差異，使吾人連想到容易形成 callus 的植株，是否早單核期或雙核期也可誘導花葯 callus 的形成？又生長勢强，產量高的植株是否與花葯 callus 的形成具有相關關係？實有待更進一步的研究。其它作物不同品種間具有不同誘導花葯 callus 的能力 [2,12,13,14,36]，其原因可能爲遺傳因子不同之故 [15,16]。在蘆筍除了品種間的差異外，株間的差異也是值得重視的問題。蘆筍屬常異交作物，進口種子一般均屬雜種，所以株間表現十分不一致，產量差異也大 [20,35]，本研究得知，不同的蘆筍株間誘導花葯 callus 的形成相差極大。造成此種巨大差異的原因，可能與不同的株間具有不同的遺傳因子及不同的表現型有關。

花葯壁在花葯培養中所扮演的角色及因花葯褐變早晚所造成 callus 或植物體之形成與否，許多文獻均曾提及 [21,24,27,34]，例如，菸草及水稻花葯培養，早期褐變之花葯產生植物體的能力比稍晚褐變之花葯爲差。本試驗結果亦發現蘆筍花葯的褐化與 callus 的能否形成具有正相關，即培養 3 星期後褐化的花葯所具形成 callus 的能力較高，這種結果乍看之下，似與菸草或水稻的結果相反，但事實上卻極爲一致。因蘆筍花葯培養後極少在初期褐化，大部分的花葯都在培養 2 ～ 3 週間轉變成褐色或白色。而蘆筍花葯 callus 的產生也在培養後 2 ～ 3 星期間，所以褐化所產生的有毒物質影響極小，相反的白化的花葯意味著培養初期即已死亡或退化，所以 callus 形成能力極差。此種結果與水

稻或菸草培養第四週褐化的花葯具有最高誘導 callus 或胚狀體形成的能力，且大部分的 callus 或胚狀體，都在第 4 週後形成的結果極爲一致。

花葯 callus 誘導植物體的產生，本研究室初步已成功，但誘導率還不高，觀察得知，植物體的產生有直接由 callus 形成芽體及根，亦有經由胚狀體的，且發現誘導之 callus 分化能力，株與株間有極大的差異，詳情正更進一步試驗中。

引 用 文 獻

1. Cateland, B. and A. Lambert. L'androgenes in vitro par culture d'antheres d'Asparagus officinalis II. Les problemes de polypoidie. Eucarpia, 4eme reunion sur la section de l'asperge. Versailles, France. : 183-191.
2. Chen, C. C. and M. H. Lin. 1976. Induction of rice plantlets from anther culture. Bot. Bull. Academia Sinica 17 : 18-24.
3. Corriols-Thevenin, L. 1979. Different methods in asparagus breeding. In Eucarpia, 5th asparagus-symposium, under the auspices of the Hassiam Minister for agriculture. 8-20. Geisenheim Forschungsanstalt, Federal Republic of Germany.
4. Dale, P. J. and M. W. Humphreys. 1973. Tissue culture. Rep. Welsh plant Breeding Stat : 88.
5. Dore, C. 1974. Production de plantes homozygotes males et femelles a partir d'antheres d'antherge, cultivees in vitro (*Asparagus officinalis* L.) C. R. Acad Sci. 278 : 2135-2138.
6. Dore, C. 1979. Different utilizations of in vitro cloning techniques. In Eucarpia, 5th asparagus-symposium, under the auspices of the Hassian Minister for agriculture. : 146-149. Geisenheim Forschungsanstalt, Federal Republic of Germany.
7. Dore, C. 1979. Anther culture as a way towards F_1 hybrids. In Eucarapia. 5th asparagus- symposium, under the auspices of the Hassian Minister for agriculture. : 87-90. Geisenheim Forschungsanstalt, Federal Republic of Germany.
8. Dunwell, J. M. and M. E. Perry. 1973. The influence of in vivo growth conditions of *N. tabacum* plants on the in vitro embryogenic potential of their anthers. John Innes Ann. Rept. 64.
9. Dunwell, J. M. 1976. A comparative study of environmental and developmental factors which influence embryo induction and growth in cultured anthers of *Nicotiana tabacum*. Environmental and Experimental Botany 16 : 109-118.
10. Engvild, K. C., I. Linde-Laursen and A. Lundqvist. 1972. Anther culture of *Datura innoxia* : flower bud stage and embryoid level of ploidy. Hereditas 72 : 331-332.
11. Falavigna, A. 1979. Pure lines of *Asparagus officinalis* L. obtained by in vitro culture in Italy. In Eucarpia, 5th asparagus-symposium, under the auspices of the Hassiam Minister for agriculture. : 91-99. Geisenheim Forschungsanstalt, Federal Republic of Germany.
12. Gresshoff, P. M. and C. H. Doy. 1972. Haploid *Arabidopsis thaliana* callus and plants from anther culture. Aust. J. Biol. Sci. 25 : 259-264.
13. Gresshoff, P. M. and C. H. Doy. 1972. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). Planta 107 (2) : 161-170.
14. Gresshoff, P. M. and C. H. Doy. 1974. Deviation of a haploid cell line from *Vitis vinifera* and the importance of the stage of meiotic development of anthers for haploid culture of this and other Genera. Z. Pflanzenphysiol. Bd. 73. S. 132-141.
15. Guha, S., R. D. Iyer, N. Gupta and M. S. Swaminathan. 1970. Totipotency of gametic cells and the production of haploids in rice. Current Science No. 8 April 20 : 174-176.
16. Guha-Mukherjee, S. 1973. Genotypic differences in the in vitro formation of embryoids from rice

pollen. Journal of Fxperimental Botany 24 : 139-144.

17. Hondelmann, W. and B. Wilberg. 1973. Breeding allmale-varieties of asparagus by utilization of anther-and tissue-culture. Z. Pflanzenzüctg 69 : 19-24.
18. Huang, C. H. 1979. Asparagus research in Taiwan. In Eucarpia, 5th asparagus-symposium, under the auspices of the Hassian Minister for agriculture. : 240-257. Geisenheim Forschungsanstalt, Federal Republic of Germany.
19. Hung, L. 1979. Feasibility of selected all-male seedlings of asparagus planting method in Taiwan. In Eucarpia, 5th asparagus-symposium, under the auspices of the Hassian Minister for agriculture. : 27-38. Geisenheim Forschungsanstalt, Federal Republic of Germany.
20. Ito, P. J. and T. M. Currence, 1965. Indreeding and heterosis in asparagus. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 86 : 338-346.
21. Lai, P. C., H. S. Tsay and N. C. Chi. 1980. The relationship between anther browning and callus formation in rice anther culture. J. Agric. Res. China 29 (2) : 137-146.
22. Löptien, H. 1979. Cytogenetic studies on sex determination in asparagus. In Eucarpia, 5th asparagus-symposium, under the auspices of the Hassian Minister for agriculture. : 21-26. Geisenheim Forschungsanstalt, Federal Republic of Germany.
23. Melle Dore, C. 1973. Androgenes in vitro par culture d'antheres d'asparagus officinalis I. Etat actuel des recherches. In Eucarpia, 4eme reunion sur la section de l'asperge. Versailles, France. : 173-182.
24. Mii, M. 1976. Relationships between anther browning and plantlet formation in anther culture of *Nicotiana tasacum* L. Z. Pflanzenphysiol. Bd. 80. S. 206-214.
25. Murashige, T., M. N. Shabed, P. M. Hasegawa, F. H. Takatori and J. B. Jones, 1972. Propagation of asparagus through shoot apex culture. I. Nutrient medium for formation of plantlets. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 97 (2) : 158-161.
26. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15 : 473-497.
27. Pelletier, G. and M. Ilami. 1972. Les Facteurs de L'androgénèse in vitro chez *Nicotiana tabacum.* Z. Pflanzenphysiol. Bd. 68. S. 97-114.
28. Pelletier, G., C. Raquin and G. Simon. 1972. La culture in vitro d'anthere d'asperge (*Asparagus officinalis*). C. R. Acad. Sci. 274D : 848-851.
29. Raquin, C. 1973. Etude de l'androgenese in vitro chez *Petunia hybrida* et *Asparagus officinalis.* Soc. Bot. Fr., Mem. 1973 : 269-274.
30. Shen, C. W. & L. Hung. 1973. Asparagus production in Taiwan. In Eucarpia, 4eme reunion sur la section de l'asperge. Versailles, France. : 21-26.
31. Shii, C. T. 1974. Recent developments in micro-propagation of asparagus. (*Asparagus officinalis* L.) Chinese Horticulture 20 (5) : 251-257.
32. Sink, K. C. Jr. and V. Padmanabhan. 1977. Anther and pollen culture to produce haploids : progress and application for the plant breeder. HortScience 12 (2) : 143-150.
33. Sun, M. H. 1979. A quarter century of asparagus development in Taiwan. In Eucarpia, 5th asparagus-symposium, under the auspices of the Hassian Minister for agriculture. : 280-293. Geisenheim Forschungsanstalt, Federal Republic of Germany.
34. Sunderland, N. 1974. Anther culture as a means of haploid induction. haploids in higher plants-advances and potential. Proc. 1st International Symp. Univ. of Guelph, Ontario, Canada. 1974.
35. Takatori, F. H., T. Murashige and J. I. Stillman. 1968. Vegetative propargation of asparagus through

tissus culture. Hortscience 3 : 20-22.
36. Tomes, D. T. and G. B. Collins. 1976. Factors affecting haploid plant production from in vitro anther cultures of *Nicotiana* species. Crop science 16 : 837-840.
37. Tsay, H. S. 1980. Strong acid treatment for making smears of tobacco microspores. J. Agric. Res. China 29 (2) : 103-106.
38. Wricke, G. 1979. Breeding research in *Asparagus officinalis*-introductory remarks. In Eucarpia, 5th Asparagus-symposium, under the auspices of the Hassian Minister for agriculture. (Abstracts) : 1-7. Geisenheim Forschungsanstalt, Federal Republic of Germany.
39. Yakuma, T., T. Harada, N. Inagaki and Y. Shiga. 1972. Studies on the anther culture of horticultural crops. I. Callus and organ formation in anther culture of asparagus. J. Jap. Soc. Hort. Sci. 41 (3) : 272-280.

Studies on anther culture and haploid plant regeneration of asparagus[1]

Hsin Sheng Tsay, Pen Chih Lai and Nai Chwen Chi[2]

Summary

Asparagus (*Asparagus officinalis* L.) anthers containing microspores in early-uninucleate to early-binuclate stages were successfully cultured in 1/2 strength Murashige and Skoog (1962) medium (except Na-Fe-EDTA) supplemented 2 mg/l NAA (Naphthalene acetic acid), 1 mg/l BA (Benzyladenine) and 6% sucrose for callus formation. Highest frequencies of callus induction were obtained from anthers with uninucleate microspores. Callus formation ability differed among varieties also among individual plants. Callus could be induced under either light or dark condition although better results were obtained when anthers at mitosis stage were cultured in darkness. Differences among individual plants of the same variety caused erratic results in this experiment. This was probably due to the genetic diversity of hybrid F_1 population.

In asparagus anther culture, there was a positive correlation between anther browning and callus formation (r=0.8046**). The color of anthers turned to brown or white after 3 weeks in culture. Callus was hardly induced from anthers with a white-color appearance.

The organogenesis was induced when callus was subcultured to Murashige et al. (1972) medium with 1 mg/l NAA and 0.5 mg/l BA. The differentiation ability were different among the six varieties tested.

---

1. Contribution No. 956 from the Taiwan Agricultural Research Institute.
2. Senior Agronomist and Research Assistant, respectively of the Department of Agronomy, TARI. Wufeng, Taichung Hsien , Taiwan 431, ROC.